



キュウリモザイクウイルスのサテライト RNA によるトマトモザイク病の病徴軽減

著者	早野 由里子, 眞岡 哲夫, 河辺 邦正, 岩崎 真人
雑誌名	北海道農業研究センター研究報告
巻	192
ページ	15-23
発行年	2010-03-01
URL	http://doi.org/10.24514/00001357

doi: 10.24514/00001357

キュウリモザイクウイルスのサテライトRNAによるトマトモザイク病の病徴軽減

早野由里子¹⁾・眞岡 哲夫²⁾・河辺 邦正³⁾・岩崎 眞人⁴⁾

．緒 言

植物においては、一旦侵入したウイルスを排除することは不可能である。こと、作物においては、発病株は減収につながる。特に、圃場内の発病株が二次感染源となり、これを看過することによって周辺株への感染が生じ、ウイルスが蔓延することも懸念される。そのため、ウイルスを防除することは、非常に重要である。

ウイルスの粒子中には、サテライトRNAと呼ばれる低分子のRNAが付随している場合がある。サテライトRNAはウイルス本体の増殖には不可欠なものではなく、その機能は完全には解明されていないが、あるものはウイルスが寄生した植物の病徴の強弱に関与すること、あるものはウイルスゲノムの蓄積量に影響を与えることなどが知られている (Roossnick *et al.* 1992)。

キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, 以下CMV) は、野菜・花き類など広範な植物を宿主とし、アブラムシによって非永続的に伝播されることが知られている。CMVはトマトの難防除ウイルスの一つであり、栽培上大きな問題となっているが、CMVによるトマトの病徴発現にこのサテライトRNAが大きく関与することが報告され、病徴を弱める性質を持つ弱毒性のサテライトRNAを用いてCMV弱毒株が作出された (吉田, 1986)。この弱毒ウイルスは、定植前のトマト幼苗一つ一つにあらかじめ接種しておく作業が必要であり、さらに簡便な防除法の開発が求められた。そこで、弱毒ウイルスに利用したサテライトRNA, sat55-1のcDNAを遺伝子導入し、トマト植物体内でsat55-1を常時発現させることにより、感染したCMVを直ちに弱毒化できる、ウイルス抵抗性トマト「No. 4 - 7 系統」(以下「No. 4 - 7」)

が作出された (河辺ら, 2002)。「No. 4 - 7」はCMVによるモザイク病に対し抵抗性を有し、その環境に対する安全性についても詳細に検証された (河辺ら2002, 岩崎ら2005, 眞岡ら2008)。

北海道農業研究センター旧ウイルス病研究室では、様々な性質を有するCMVのサテライトRNAを分離・保有しており、その利用を図るため研究を行ってきた。前述のようにCMVによるトマトモザイク病や条斑病の防除に有効な弱毒ウイルスを作出した。本来弱毒ウイルスは予防のために用いられるが、我々は、偶然、CMVの感染により発病したトマトの病徴が弱毒ウイルスの接種により軽減するという現象を見出した。そこで、本研究では、この現象がサテライトRNAに起因するものであることを示し、ウイルス病治療の可能性を探るため、CMVによるトマトモザイク病に対する病徴軽減効果の検証を行った。

．材料および方法

1. 供試ウイルス

感染してもほとんど病徴を示さないICMV-P7 (以下P7) を、サテライトRNAを伝搬するためのウイルス (ヘルパーウイルス) として、その粒子内にサテライトRNA sat55-1 (以下sat55-1, DDBJ/EMBL/GenBank accession number (以下略) AB072502) を内包するCMV-P7 (sat55-1) (以下P7 (55-1)) 株およびサテライトRNA sat28-19 (以下sat28-19, AB072503) を内包するCMV-P7 (sat28-19) (以下P7 (28-19)) を弱毒ウイルスとして二次接種に用いた。強毒ウイルスとしてCMV-42CM株 (以下42CM, AB368496 ~ 98, 岩崎ら (1996)) を一次接種に用いた。また、ヘルパーウイルス単独やサテライトRNA分子も二次接種に供した。sat55-1は、P7 (55-1) 株より純化精製し、トマト1株に対し約150ngを接種に用いた。

各ウイルス株の増殖にはタバコ *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi ncを用い、タバコ感染葉の汁液 (5 ~

平成21年6月16日 原稿受理

1) 現病害抵抗性研究チーム

2) 現バレイショ栽培技術研究チーム

3) 現国際農林水産業研究センター

4) 退職

10倍液)をカーボランダム法により接種することでウイルスの増殖を図った。病徴および収量への影響調査には、トマト (*Solanum lycopersicum* L.) 品種「桃太郎」を用いた。

2. 病徴軽減試験 (試験 1 ~ 5)

温室内において、トマト品種「桃太郎」の葉に一次接種としてCMV強毒株42CMを汁液接種した。接種後一定期間おいた後、弱毒株P7 (55-1)を二次接種した (試験 1 ~ 5)。一次接種は子葉 ~ 第3葉に行い、二次接種は常に最上位葉に行った。二次接種から約30 ~ 60日後病徴観察を行った。無接種、強毒株のみを接種したトマトを同様に栽培し、比較対照とした。試験 1 (表 1) は、モザイク症状の軽減効果を確認することを目的とした。試験 2 ~ 4 (表 2) は、軽減効果と接種時期の関係を調べる目的とし、一次接種から経過日数を変えて二次接種を行った。試験 3 および 4 (表 2 - 2 および 3) については病徴観察のほか、草丈および茎葉生重量の測定も行った。試験 5 (表 3) では、弱毒株P7 (55-1) の他、ヘルパーウイルス単独およびsat55-1も二次接種源として用いて、その効果の比較を行った。

3. 果実への影響調査 (温室, 試験 6)

トマト品種「桃太郎」を用いて、病徴軽減試験と同様に、強毒株42CM (一次)、弱毒株P7 (55-1) (二次) の接種を行い、それぞれ 8 株について果実収量調査を行った。なお、栽培は11号鉢 (直径33cm) を用いて温室内で行った。第3葉期のトマト「桃太郎」に、強毒株42CMを接種し、1週間後 (4葉期)、2週間後 (6葉期)、4週間後 (11葉期) および6週間後 (16葉期) に、それぞれ弱毒株P7 (55-1) を二次接種した。栽培中、草丈の測定および果実の収穫を順次行い、収穫果実数を計数するとともに各果

実の重量を測定した。

4. 圃場における病徴軽減効果の検証 (試験 7, 8)

温室内で育苗したトマト品種「桃太郎」 (第1葉抽出期) の子葉に強毒株を一次接種した。2週間後第2および3葉に弱毒株P7 (55-1) またはP7 (28-19) を二次接種し、6葉期まで育成したトマトを、北海道農業研究センター内圃場に設置したビニールハウスに定植した。試験は2000年 (試験 7)、2001年 (試験 8) の2カ年行い、各接種区とも6 ~ 8株を供試した。施肥、整枝は一般的な栽培管理に従って行い、病徴観察および果実収量調査を行った。なお、試験 7 については、ウイルス濃度の測定も行った。ウイルス濃度の測定は、二次接種した葉よりも上位の葉すべてを採取し、磨砕した汁液の1000倍希釈液を用いて、DAS-ELISA法により行った。ウイルス濃度は、純化42CMを標準試料として作成した検量線を用いて、各試料の吸光度A405から算出した。なお、CMVの純化は岩崎ら (1996) の方法により行った。

・ 結 果

1. 弱毒ウイルスによる病徴軽減 (試験 1 ~ 5)

トマト幼植物にあらかじめ激しいモザイク症状を引き起こすCMV強毒株42CMを一次接種し、モザイク症状を確認した後に、CMVによるモザイク病に対し予防接種ワクチンとしての効果のあるCMV弱毒株P7 (55-1) を二次接種した。病徴軽減は、二次接種より約3週間後の新葉より表れ、30日後の上位葉では明瞭となった (表 1)。その後の新葉では病徴軽減は維持され、強毒株のみを接種したトマト植物に比べ、その病徴はより顕著に軽くなった。しかし、最初に病徴軽減が認められた葉よりも下位にある葉においては病徴の軽減は見られなかった (表 1)。

表 1. 弱毒ウイルスの接種によるモザイク症状トマトの病徴軽減 (試験 1)

二次接種株	供試株数	二次接種 30 日後の病徴			二次接種 45 日後の病徴		
		上位葉 (16-13L)	中位葉 (12-9L)	下位葉 (8-4L)	上位葉 (21-18L)	中位葉 (17-12L)	下位葉 (11-4L)
P7(55-1)	15	+ ~ ++	+++	+++	- ~ +	+	++ ~ +++
(強毒)	15	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(無接種)	6	-	-	-	-	-	-

一次接種は2 ~ 3葉、二次接種は5 ~ 7葉期に行った。二次接種より30日後および45日後の各個体の病徴を調査した。病徴は、無病徴 (-), 軽度 (+), 中程度 (++)、重度 (+++) で示す。

表 2 . 弱毒ウイルスによるモザイク症状の軽減効果と接種時期の関係

(試験 2 ~ 4)

1 . 試験 2 (一次接種 : 2 ~ 3 葉期 , 二次接種までの日数 : 8 ~ 42 日)

二次接種時 葉期	一次接種後 日数	供試株 数	葉位別の病徴		
			上位葉	中位葉	下位葉
(無接種)		6	-	-	-
4L	8	6	-	+	++
7 ~ 8L	28	6	- ~ +	+ ~ ++	+++
12 ~ 13L	42	6	+ ~ ++	++	+++
(強毒)		6	+++	+++	+++

一次接種は 2 ~ 3 葉 , 二次接種は 4 , 7 ~ 8 , 12 ~ 13 葉期に行い ,
病徴の調査は二次接種より 45 日後に行った。病徴の表記は表 1 に同じ。

2 . 試験 3 (一次接種 : 2 ~ 3 葉期 , 二次接種までの日数 : 5 ~ 19 日)

二次接種時 葉期	一次接種 後日数	供試株 数	葉位別の病徴			草丈 (cm)	地上部生重量 (g)
			上位葉	中位葉	下位葉		
(無接種)		6	-	-	-	83.6 ± 2.5a ¹⁾	165.1 ± 19.2a ¹⁾
2L	5	5	-	- ~ +	+	85.6 ± 3.2a	153.1 ± 12.4a
4 ~ 5L	12	5	- ~ +	+	+	80.4 ± 6.0a	119.7 ± 6.2a
7 ~ 8L	19	5	- ~ +	+	+ ~ ++	77.8 ± 5.1a	125.0 ± 10.2a
(強毒)		5	+++	+++	++	42.3 ± 8.0b	71.1 ± 12.3b

一次接種は 2 ~ 3 葉 , 二次接種は 2 , 4 ~ 5 , 7 ~ 8 葉期に行い , 病徴 , 草丈および地上部生重量の調査は二次接種より 45 日後に行った。病徴の表記は表 1 に同じ。草丈および地上部生重量はそれぞれ平均値と標準偏差を表す。¹⁾は異なる文字は 1% 水準で有意差あり。

3 . 試験 4 (一次接種 : 子葉期 , 二次接種までの日数 : 7 ~ 27 日)

二次接種時 葉期	一次接種 後日数	供試 株数	葉位別の病徴			草丈 (cm)	地上部生重量 (g)
			上位葉	中位葉	下位葉		
(無接種)		6	-	-	-	82.5 ± 5.2a ¹⁾	109.1 ± 9.3a ¹⁾
1 ~ 2L	7	6	- ~ +	+	+ ~ ++	68.7 ± 3.6b	84.7 ± 4.4b
3 ~ 4L	17	6	+	+ ~ ++	++	73.0 ± 5.6b	77.2 ± 10.7b
6 ~ 7L	27	6	+ ~ ++	++	+++	73.0 ± 6.0b	78.1 ± 19.9b
(強毒)		6	+++	+++	+++	56.3 ± 10.1c	42.4 ± 7.0c

一次接種は子葉 , 二次接種は 1 ~ 2 , 3 ~ 4 , 6 ~ 7 葉期に行い , 病徴 , 草丈および地上部生重量の調査は二次接種より 45 日後に行った。病徴の表記は表 1 に同じ。草丈および地上部生重量はそれぞれ平均値と標準偏差を表す。¹⁾は異なる文字は 1% 水準で有意差あり。

さらに , 接種時のトマトの葉期を変えて , 病徴軽減効果と接種時期の関係を詳細に調べた (試験 2 ~ 4 , 表 2 - 1 ~ 3)。いずれも試験 1 と同様に , 弱毒ウイルスの二次接種により , 病徴の回復を確認することができた。強毒株の接種時の植物が若ければ若いほど , 病徴は激しくなる傾向があった。また , 一次接種から二次接種までの間隔が短いほど , 速やかに病徴が軽減された。その間隔が 25 日以上の場合 (表 2 - 1 中 7 ~ 8L , 12 ~ 13L 接種および表 2 - 3

中 6 ~ 7L 接種) , 上位葉でも明瞭なモザイク病徴が観察された。試験 3 および 4 については , 42CM の主たる症状であるモザイク病徴の観察に加え , 植物体全体の回復状態を測る目的で , 草丈および地上部生重量を測定した (表 2 - 2 および 3)。その結果 , 病徴軽減程度との相関は明快ではないものの , 草丈 , 地上部生重量とも弱毒ウイルスの二次接種により回復した。

表3. トマトモザイク症状の病徴軽減に対する二次接種源の比較 (試験5)

試験区	二次接種	供試株数	葉位別の病徴			草丈 (cm)	地上部生重量 (g)
			上位葉	中位葉	下位葉		
無接種	無	9	-	-	-	120.2 ± 7.2a ¹⁾	145.7 ± 10.7a ¹⁾
弱毒	P7(55-1)	14	- ~ +	+ ~ ++	+++	98.1 ± 8.8b	83.5 ± 10.3b
RNA単独	sat55-1	14	- ~ +	+ ~ ++	+++	96.9 ± 7.3b	77.9 ± 9.7b
ヘルパーウイルス	P7	15	+++	+++	+++	60.9 ± 13.8c	55.9 ± 9.0c
強毒	無	15	+++	+++	+++	57.1 ± 13.6c	53.5 ± 6.1c

一次接種は子葉，二次接種は5～6葉期に行い，病徴，草丈および地上部生重量の調査は二次接種より60日後に行った。病徴の表記は表2に同じ。草丈および地上部生重量はそれぞれ平均値と標準偏差を表す。

¹⁾は異なる文字は1%水準で有意差あり。

2. 病徴軽減因子の特定 (試験5)

CMVによるトマトモザイク症状の軽減が弱毒ウイルスに起因したものであるかを調べるために，弱毒株P7(55-1)を，それぞれヘルパーウイルスとサテライトRNAに分け，強毒ウイルス感染トマトに二次接種し，病徴程度，草丈および地上部生重量を調査した。その結果を表3にまとめた。sat55-1を持たないヘルパーウイルスP7を単独で二次接種源に用いた区では，強毒ウイルス接種のみを行った強毒区と同様に重度のモザイク症状を呈し，草丈および地上部生重量にも顕著な差異は認められなかった。これに対し，精製したsat55-1を単独で二次接種したトマトは，弱毒株を接した場合と同様に病徴程度の回復が観察された。このため，弱毒ウイルスP7(55-1)の接種によるモザイク病徴の軽減は，ヘルパーウイルスではなく，ヘルパーウイルスに内包されるサテライトRNAによる効果と考えられた。

3. トマトの果実収量における病徴軽減効果 (試験6～8)

試験6では，病徴や草丈に見られた軽減効果の果実に対する影響を調べた。

一次接種と二次接種の間隔が短いほど，果実収量は健全株に近い値を示し，すなわち強毒株の接種後二次接種をより早く行うほど果実の減収も抑制された(図1)。累積果実収量(収穫期間68日間)は，健全区を100とすると，強毒株のみを接種し弱毒株を接種しない強毒区の場合，約95%の減収となった。これに対し，1週間後弱毒株接種での果実の減収は約18%に留まったが，その後の減収率は大きく，2週間後接種では約50%，4週間後接種では約57%，6週間後接種では約74%となった。また，草

丈においても，同様な傾向が見られた(図2)

続いて，圃場栽培試験を2ヵ年実施した(2000年試験7および2001年試験8)。2種の弱毒株P7(55-1)およびP7(28-19)はともに，1株あたりの収穫果実の個数，総収穫重量および果実1個あたり平均重を強毒株接種のみに比べ著しく回復させた(表4)。特に果実1個あたり平均重の回復は大きく，健全区を100とすると，強毒区がわずかに50～52であるのに対し，P7(28-19)接種区では74～86であった。P7(28-19)弱毒株を用いた試験区では，2ヵ年の試験において，P7(55-1)接種区よりも高い軽減効果を示した。また，ウイルス濃度を比較したところ，一般にウイルス濃度は個体ごとに変動が大きいものの，20日後では，弱毒区におけるウイルス濃度は，強毒区の13～16%とかなり低く，その後，30，40日後と経過するに従って，強毒区ウイルス濃度は急増し，両者の差は顕著になった(表5)。弱毒ウイルスを予防接種ワクチンとして用いた際に見られる干渉作用と同様に，強毒ウイルス接種後の弱毒ウイルスの接種によってもトマト植物体内でのウイルスの増殖は抑制された状態にあると考えられた。

以上，試験5と試験7および8は試験条件が異なっており，厳密に比較できないものの，弱毒株の接種は，トマト植物体内でのウイルス増殖を抑制し，モザイク病による果実の減収を抑制できることが明らかとなった。

考 察

本研究で用いた弱毒ウイルスは，病徴を軽減する作用を持つサテライトRNA sat55-1をCMV-Pに内包させたもので(吉田ら，1992)，トマト条班病の予防

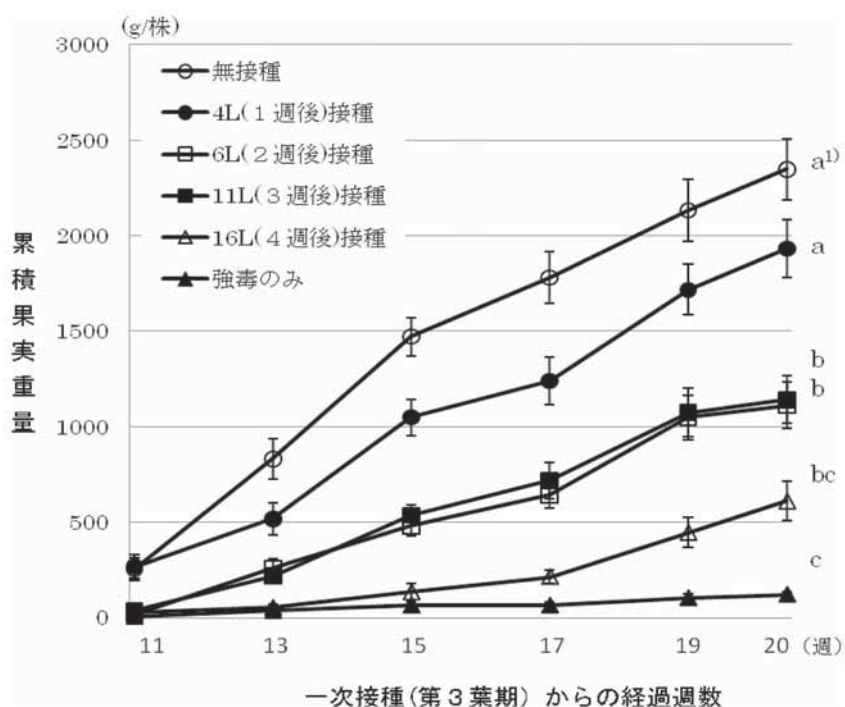


図1．弱毒ウイルス接種モザイク症状トマトの果実収量(試験6)

第3葉期のトマトに強毒株 42CM を接種し、一週間間隔で弱毒株 P7(55-1)を二次接種した。温室内で栽培し、収穫した果実の重量を測定した(各試験区 8 株を供試)。株ごとの累積収穫果実重量を表した。マーカーに付した縦線は標準偏差を示す。

¹⁾は異なる文字は 1%水準で有意差あり。

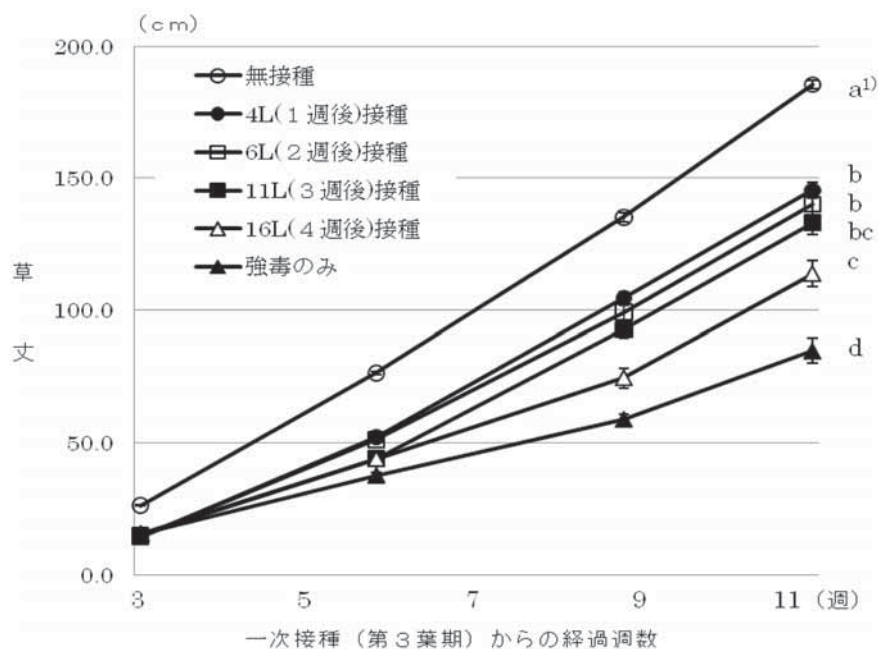


図2．弱毒ウイルス接種のモザイク症状トマトの草丈の推移(試験6)

第3葉期のトマトに強毒株 42CM を接種し、一週間間隔で弱毒株 P7(55-1)を二次接種した。温室内で栽培し、草丈を測定した(各試験区 8 株を供試)。マーカーに付した縦線は標準偏差を示す。

¹⁾は異なる文字は 1%水準で有意差あり。

表4. ビニールハウス栽培における弱毒ウイルスによるトマトモザイク病の病徴軽減効果

1. 試験7 (2000年)

試験区	供試株数	果実数(個/株)	果実重量(g/株)	平均重(g/個)
無接種	18	17.1(100)a ¹⁾	2703(100)a ¹⁾	157.3(100)a ¹⁾
強毒のみ	18	2.1(12)b	167(6)b	82.4(52)b
弱毒1 P7(55-1)	18	10.3(60)ab	1258(47)ab	122.2(78)ab
弱毒2 P7(28-19)	18	13.1(77)a	1774(66)ab	135.6(86)a

2. 試験8 (2001年)

試験区	供試株数 ¹⁾	果実数(個/株)	果実重量(g/株)	平均重(g/個)
無接種	24	23.4(100)a ¹⁾	4540(100)a ¹⁾	193.8(100)a ¹⁾
強毒のみ	24	7.6(32)b	735(16)b	88.5(50)b
弱毒1 P7(55-1)	22	11.6(50)bc	1404(31)b	113.0(57)b
弱毒2 P7(28-19)	24	15.0(64)c	2175(48)c	144.1(74)c

子葉に強毒株 42CM を一次接種し、2～3葉期に弱毒株 P7(55-1)もしくは P7(28-19)による二次接種を行った。収穫果実の重量を測定し、60日間(試験7)、50日間(試験8)の株ごとの累積収穫量から各項目の値を算出した。カッコ内には無接種区を100とした時のそれぞれの値を示す。

¹⁾は異なる文字は1%水準で有意差あり。

に効果を示すことが実証されている(本田ら, 1993)。弱毒ウイルスの予防的接種は、不測のウイルス病の発生と蔓延、それによって引き起こされる作物の減収を抑制できる効果が期待できる。しかし、一方では、一作毎に定植前のトマト一株一株に弱毒ウイルス接種するために労力と時間が要するという弱点がある。そこで、我々は、病徴を軽減させる効果をもつ sat55-1 の cDNA をトマトへ遺伝子導入し、恒常的な抵抗性の付与を試みた。その結果、sat55-1 形質転換トマトは、CMV によるモザイク病に対し、抵抗性を発現した(河辺ら2002, 岩崎ら2005)。野外試験によりその安全性も確認したが、品種登録には至らず、実用栽培はされていない。

弱毒サテライトRNAをウイルスの防除に用いようとする試みは、sat55-1やsat28-19の他にも多数の報告例がある(HARRISON *et al.*, 1987, JACQUEMOND *et al.*, 1988, MASUTA *et al.*, 1994, MCGARVEY *et al.*, 1994, PEÑA *et al.*, 1994, SAITO *et al.*, 1992, SAYAMA *et al.*, 1993, TIEN *et al.*, 1991, YIE and TIEN, 1993, YIE *et al.*, 1995, YIE *et al.*, 1992)。本報告は、従来の予防的利用ではなく、治療的利用という、弱毒サテライトRNAの新たな利用の可能性を検討した。CMV強毒株を接種したトマトでは、接種後わずかな期間で明瞭なモザイク症状を生じる。モザ

イク症状を確認したCMV感染トマトに、さらに弱毒ウイルスを接種したところ、約3週間後の展開葉よりモザイク症状は軽くなった。弱毒ウイルスは治療的に利用しても効果があることが判明した。完全な治療、つまり、治癒にはいたらないものの、CMVによるモザイク病の病徴を軽減し、ウイルス量も減じ、さらに、果実収量の減収を抑制できることが明らかとなった。

弱毒ウイルスの効果は、ヘルパーウイルスに内包されるサテライトRNAによるものであり(吉田, 1986), RNA分子単独の接種でも弱毒ウイルスを用いた場合と同様の病徴軽減効果が得られた。サテライトRNAは植物体内において単独では存在せず、ウイルス粒子に取り込まれる。接種後サテライトRNAは感染植物体内に存在するCMVに取り込まれたのち、ウイルスと共に移行し、ウイルスの増殖を抑制し、結果として軽減効果を示すと考えられる。弱毒ウイルスという完全な形態ではなく、RNA分子を直接接種に用いることにより、ウイルス感染株にのみ作用できるという利点は大きい。つまり、圃場でウイルス病発病株の周辺株にサテライトRNAを施用した場合、ウイルス非感染株には何ら影響を与えることなく、また、弱毒ウイルスの予防的利用に見られるような、ヘルパーウイルスを圃場に蔓延させることな

く、ウイルスを保有している植物のみを対象とした防除が可能となる。

一般に、植物ウイルス病においては、侵入したウイルスを植物体から排除することは不可能である。農作物では、病原であるウイルスに直接作用する効果的な防除薬剤はなく、ウイルス病に発病した植物体は、二次感染を防ぐため、発病株は速やかに圃場から除去される。発病株を排除しても、発病株発見時点で、周辺の株へのウイルス感染が懸念される。場合によっては、発病していないが感染が疑わしい周辺株の排除、さらには、媒介生物の排除のための薬剤散布が必要とされるかもしれない。薬剤散布に代えて、本試験で用いた弱毒ウイルス株もしくはサテライトRNAを接種することは可能であると考えられる。温室実験レベルでは、両者の軽減効果に差は認められなかった（表5）。接種にかかる時間や労力も手法が同じであることから、差はないものと考えられた。一方、サテライトRNAは、試験管内合成が可能であるため、自然界で懸念されるような変異（PALUKAITIS and ROOSSINCK, 1996）の心配もなく、接種源の安定供給が可能である。RNA分子の安定性、保存性や圃場での効果については検討が必要と考えられる。いずれにしても、サテライトRNAによる新たなウイルス病の予防・治療が可能と考えられる。

．謝 辞

本研究は、2000年12月に急逝した岩崎真人博士が中心となって進められたものである。本研究を支えてくださった多くの先輩同輩に深く感謝する。

．摘 要

植物ワクチンとして予防的に利用されている弱毒ウイルスの治療的利用について検討した。すなわち、CMVの感染により発病したトマトのモザイク症状が弱毒ウイルスの接種により軽減することを明らかに

した。また、この現象は弱毒効果を有するサテライトRNAに起因するものであった。その結果、CMVによるトマトモザイク病の果実減収を抑制できることを示し、ウイルス病治療の可能性を提示した。

．引用文献

- 1) ROOSSINCK, M.J., SLEAT, D. and PALUKAITIS, P. (1992): Satellite RNAs of plant viruses. Microbiol. Rev., 56, 265-279.
- 2) 吉田幸二 (1986): サテライトRNA置換による弱毒CMVの作出. 植物防疫. 40, 510-515.
- 3) 河辺邦正・岩崎真人・早野由里子・本田要八郎・吉田幸二・眞岡哲夫 (2002): サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第1報 抵抗性トマト系統の作出. 北海道農研研究報告. 177, 37-53.
- 4) 岩崎真人・伊藤喜三男・河辺邦正・杉戸智子・新田恒雄・瀧川重信・伊藤清光・中田唯文・小川恭男・早野由里子・福本文良 (2005): サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第2報 組換えトマトの形態・生育特性と環境に対する安全性評価. 北海道農研研究報告. 182, 51-63.
- 5) 眞岡哲夫・早野由里子・河辺邦正・福本文良・柏崎 哲・岩崎真人 (2008): サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明. 北海道農研研究報告. 188, 29-43.
- 6) 岩崎真人・山本孝彗・稲葉忠興 (1996): ウィルスによるかぼちゃ台接ぎ木キュウリの萎凋病に関する研究. 四国農試報告. 60, 1-88.
- 7) 吉田幸二・後藤忠則・本田要八郎 (1992): キュウリモザイクウイルス (CMV) の弱毒ウイルスの改良. 日植病報. 58, 116-117 (講演要旨).

表5．病徴の軽減とウイルス濃度（試験7）

試験区	二次接種	供試株数	病 徴 ¹⁾				ウイルス濃度 (ng/ml) ²⁾			
			10 日後	20 日後	30 日後	40 日後	10 日後	20 日後	30 日後	40 日後
強毒	無	6	+++	++~+++	+++	+++	1064±1434a ³⁾	150±87.4a ³⁾	671±306a ³⁾	1370±710
弱毒1	P7(55-1)	6	+++	+~+++	+~++	+~++	375±444a	25±9.9b	37±4.5b	37±7.5
弱毒2	P7(28-19)	6	+++	+~+++	+~++	±~++	965±886a	20±11.5b	38±3.4b	77±17.8

¹⁾病徴は個体別、葉位別および植物体全体を観察し、植物体全体から判断した病徴を記した。病徴の表記は表1に同じ。

²⁾ウイルス濃度は、各検体の汁液1000倍希釈液を用いて測定し、各試験区供試6株の平均値と標準偏差を記した。

³⁾は異なる文字は1%水準で有意差あり。

- 8) 本田要八郎・吉田幸二・後藤忠則 (1993): トマト条班病常発地域における弱毒ウイルス予防接種による防除効果. 北日本病虫研報. 44, 56-58.
- 9) HARRISON, B.D., MAYO, M.A. and BAULCOMBE, D.C. (1987): Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328, 799-802.
- 10) JACQUEMOND, M., ASMELEM, J. and TEPFER, M. (1988): A gene coding for a mono-meric form of cucumber mosaic virus satellite RNA confers tolerance to CMV. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1, 311-316.
- 11) MASUTA, C., HAYASHI, Y., SUZUKI, M., KUWATA, S., TAKANAMI, Y. and KOIWA, A. (1994): Protective effect of a satellite RNA expressed in transgenic plants on disease incidence after inoculation of cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 60, 228-232.
- 12) MCGARVEY, P. B., MONTASSER, M.S. and KAPER, J.M. (1994): Transgenic tomato plants expressing satellite RNA are tolerant to some strains of cucumber mosaic virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119, 642-647.
- 13) PEÑA, L., TRAD, J., DIAZ-RUIZ, J.R., V MCGARVEY, P.B. and KAPER, J.M. (1994): Cucumber mosaic virus protection in transgenic tobacco plants expressing monomeric, dimeric or partial sequences of a benign satellite RNA. *Plant Sci.*, 100, 71-81.
- 14) SAITO, T.K., MASUTA, C., KUMASHIRO, T. and TAKANAMI, Y. (1992): Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.
- 15) SAYAMA, H., SATO, T., KOMINATO, M., NATSUAKI, T. and KAPER, J.M. (1993): Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology*, 83, 405-410.
- 16) TIEN, P. and WU, G. (1991): Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv. Virus Res.*, 39, 321-339.
- 17) YIE, Y. and TIEN, P. (1993): Plant virus satellite RNAs and their role in engineering resistance to virus diseases. *Seminars in Virology*, 4, 363-368.
- 18) YIE, Y., WU, Z. X., WANG, S. Y., ZHAO, S. Z., ZHANG, T. Q., YAO, G. Y. and TIEN, P. (1995): Rapid production and field testing of homozygous transgenic tobacco lines with virus resistance conferred by expression of satellite RNA coat protein of cucumber mosaic virus. *Transgenic Research*, 4, 256-263.
- 19) YIE, Y., ZHAO, R., ZHAO, S. Z., LIU, Y. Z., LIU, Y. L. and TIEN, P. (1992): High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivator G-140. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5, 460-465.
- 20) PALUKAITIS, P. and ROOSSINCK, M.J. (1996): Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology*, 14, 1264-1268.

Attenuation Effect of Satellite RNA on Cucumber mosaic virus-diseased Tomato Plants

Yuriko HAYANO-SAITO¹⁾, Tetsuo MAOKA²⁾, Kunimasa KAWABE³⁾, and Mabito IWASAKI⁴⁾

Summary

It is thought that virus diseases in plants can not to be cured by application of chemicals. Removal of diseased plants from the field is the sole practical counter-measure to prevent diffusion of virus disease. In agriculture as well as medicine, attenuated viruses are used preventively as vaccines to protect plants from damage caused by viruses. We found that an attenuated virus having a satellite RNA reduced symptoms on diseased tomato plants infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV). Inoculation tests under various conditions were performed to investigate the ability of the attenuated CMV to reduce mosaic symptoms on CMV-diseased tomato plants. Mosaic symptoms were alleviated from the top leaf of the

diseased plants about 3 weeks after inoculation by post-inoculation of an attenuated virus having a satellite RNA. Furthermore, the attenuated virus improved the quality and quantity of tomato fruits. Symptoms were reduced more effectively if the interval between infection with the CMV strain and inoculation of the attenuated virus was short. The effect was more pronounced on young plants. Challenge inoculation exclusively with satellite RNA molecules resulted in cure of the CMV-diseased tomato plants, indicating that the alleviation of symptoms was due to the satellite RNA. These results show the possibility of plant virus disease protection by satellite RNA that attenuates CMV, i.e., therapy for plant virus disease.

1) Rice Disease Resistance Research Team (Hokkaido Region)

2) Potato Production and Protection Research Team

3) Japan International Research Center for Agricultural Sciences

4) Retired